



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0075272 호
Application Number 10-2003-0075272

출 원 년 월 일 : 2003년 10월 27일
Date of Application OCT 27, 2003

출 원 인 : 주식회사 에프앤피
Applicant(s) FNP, Inc.

2004 년 11 월 15 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

특허출원서	특허출원서
특허청장	특허청장
출원일자	2003.10.27
발명의 명칭	오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 상기 식물체를 검출하는 방법
발명의 영문명칭	Plant resistant to cucumber mosaic virus and method for detecting the plant
출원인	
【성명】	김신제
【출원인코드】	4-2002-021744-6
대리인	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2003-073325-5
발명자	
【성명】	김신제
【출원인코드】	4-2002-021744-6
발명자	
【성명의 국문표기】	황주광
【성명의 영문표기】	HWANG, Ju Kwang
【주민등록번호】	440728-1001612
【우편번호】	135-280
【주소】	서울시 강남구 대치동 은마아파트 28동 304호
【국적】	KR
발명자	
【성명의 국문표기】	김군보
【성명의 영문표기】	KIM, Goon-Bo
【주민등록번호】	710810-1951112
【우편번호】	441-340
【주소】	경기도 수원시 권선구 구운동 949-3 동원빌라 102호
【국적】	KR

▶명지]
- 【성명의 국문표기】 김 수
【성명의 영문표기】 KIM,Su
【주민등록번호】 720620-1794317
【우편번호】 361-201
【주소】 충북 청주시 흥덕구 분평동 분평주공2단지 213동 905호
【국적】 KR
▶산염기 및 아미노산 서열 목록]
【서열개수】 28
【서열목록의 전자파일】 첨부
▶지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.
대리인
김석현 (인)
▶수수료]
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 19 면 19,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원
【합계】 48,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 14,400 원
▶부서류] 1. 요약서·명세서(도면)_1종

【요약서】

【약】

본 발명은 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 상기 식물체를 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 서열번호 22로 기재되는 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는 프라이머를 이용하여 상기 식물체를 검출하는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 프라이머 및 상기 프라이머에 의해 증폭된 DNA 단편을 이용하여 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 오이 모자이크 바이러스를 식물체에 직접 접종하지 않고서도 신속하고 정확하게 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 검출할 수 있는 장점이 있다.

【표도】

도 7

【언어】

이 모자이크 바이러스, 저항성 선별 마커, RAPD

【명세서】

1. 명칭의 명칭

오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 상기 식물체를 검출하는 방법 [Plant resistant to cucumber mosaic virus and method for detecting the plant]

2. 명세서의 간단한 설명

도 1은 오픈 프라이머 (OPC-04 내지 OPC-08 및 OPC-10)를 이용하고 오이 모자이크 바이러스 저항성 DNA 풀 (pool) (R)과 이병성 DNA 풀 (S)을 주형으로 사용하여 PCR 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2a 및 도 2b는 저항성 식물체 (R₀) 및 그의 F1 (R₁), 이병성 식물체 (S₀) 및 그의 F2 (S₁), 저항성 F2 및 이병성 F2에 대하여 RAPD-PCR을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 OPC-07 프라이머에 의해 증폭된 DNA 절편을 탐침으로 하여 서던블롯을 수행한 결과이다.

R: 저항성 식물체

S: 이병성 식물체

도 4는 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머를 이용하여 CAPS를 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5는 서열번호 23 및 서열번호 25의 프라이머 조합을 이용하여 CAPS를 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

A: *EcoRI* 으로 절단한 경우

B: *XbaI* 으로 절단한 경우

도 6은 서열번호 23 및 서열번호 26의 프라이머 조합을 이용하여 CAPS를 수행 결과를 나타내는 사진이다.

도 7은 서열번호 27 및 서열번호 28을 이용하여 CAPS를 수행한 결과를 나타내 사진이다.

발명의 상세한 설명]

발명의 목적]

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술]

본 발명은 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 이를 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 오이 모자이크 바이러스 저항성 인자를 함유하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 오이 모자이크 바이러스 저항성 유전자와의 관청도가 높은 염기서열을 이용하여 상기 식물체를 검출하는 방법에 관한 것이다.

오이 모자이크 바이러스 (Cucumber Mosaic Virus: 이하 'CMV'라 함)는 식물 바이러스 중에서도 기주 범위가 가장 넓은 식물병원 바이러스로서 전세계적으로 쌍

업 및 단지업의 약 800여 종의 식물에 큰 경제적 피해를 주고 있다. 식물이 CMV에 감염되면 잎, 줄기 및 과실에 모자이크 증상을 나타낸다. 특히 병에 걸린 잎은 작지하고 조금조글해지며, 잎맥을 따라 괴리가 생기게 된다. 과실에는 녹색농담의 모이크가 나타나고 울퉁불퉁해져 상품가치가 떨어진다.

한편, 병 저항성 품종을 육종하기 위해서는 병 저항성 인자를 갖는 다른 품종으로부터 계속적인 육교배를 통하여 그 인자를 도입하여야 하며, 도입 단계마다 저항성 인자를 거쳐 선발하여야 하는데, 이러한 선발 단계에서 상기 병 저항성 인자와 밀접하게 연관되어 있는 분자 표지를 이용한다면 매우 편리할 것이다. 따라서, 분자 표지를 이용한 CMV의 진단 방법 및 형질 전환을 통한 CMV 저항성 품종 개발에 대한 다양한 기술들이 개발되어 왔다. 예를 들면, 대한민국 특허출원 제2000-0025689호에서 쿠쿠모바이러스(Cucumovirus) 그룹에 속하는 CMV, 땅콩 위축 바이러스 및 토마토 스퍼미 바이러스를 한 가지 세트의 유전자 증폭용 프라이머로 진단할 수 있는 쿠쿠모바이러스 진단용 프라이머의 염기서열 및 이를 이용한 유전자 진단 및 동정 방법을 제시하고 있다. 대한민국 특허등록 제0293567호에서는 국내에서 분리한 CMV 외피 단백질 유전자를 토마토에 형질 전환시키는, CMV에 대한 저항성 계통의 개발 방법을 시하고 있다. 또한, 대한민국 특허출원 제1993-0029605호에는 작물에 병을 일으키는 CMV에 대하여 저항성을 갖는 형질전환 작물을 제조하기 위해 CMV 외피 단백질 유자의 RNA를 공격하는 망치머리형 라이보자임이 기재되어 있다.

상기한 바와 같이, CMV 저항성의 진단 및 CMV 저항성을 갖는 식물의 개발에 관 종래의 기술들은 모두 CMV의 외피 단백질 유전자를 그 대상으로 하고 있으며, 식 체 고유의 CMV의 저항성 인자에 대한 기술 개발은 보고된 바 없다.

따라서, CMV 저항성 인자를 갖는 식물체 제공으로부터 상기 바이러스 저항성 판
문자 표지의 개발 및 개발된 문자 표지를 이용하여 식물체에서의 CMV 감염 여부를
단하는 방법의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제]

본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, CMV 저항성 인자를 함유
는 CMV 저항성 식물체를 제공한다.

또한 본 발명은 CMV 저항성 유전자와의 연관정도가 매우 높은 염기서열을 이용
여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 구성 및 작용]

상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 22로 기재
는 염기서열을 함유하는 CMV 저항성 식물체를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 22로 기재되는 염
기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 22로 기재되는
염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는 CMV 저항성 식물체 검출용
프라이머 및 이를 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 프라이머를 이용하여 CMV 저항성 식물체
검출하는 방법을 제공한다.

나아가 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는 표지인자를 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다.

본 발명에서 '오이 모자이크 바이러스(CMV) 저항성 식물체'라 함은, 서열번호로 기재되는 염기서열을 함유하며 CMV에 대하여 저항성의 형질을 나타내는 식물체 말한다. 상기 식물체에는, 이에 제한되지는 않으나, 오이, 수박, 고추, 메론, 배, 담배, 페루니아, 목화 및 장미가 포함된다. 또한 상기 식물체는 식물의 기관, 즉, 세포, 종자 및 캘러스를 포함한다.

또한 본 발명에서 'CMV 저항성 유전자에 근접한 부위의 염기서열'이란 서열번호로 기재되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드로서, CMV 저항성 형질과 밀접하게 관련 서열을 말하는 것이다. 상기 서열번호 22의 염기서열은 CMV 저항성 유전자와 당히 근접되어 있으므로, 상기 염기서열들이 나타내는 어떠한 다형성을 사용하더라도 유전자의 존재여부를 파악하는 데 사용할 수 있다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 CMV 저항성 인자를 갖는 CMV 저항성 식물체를 제공한다. 상기 CMV 저항성 인자는 서열번호 22로 기재되는 염기서열이다. 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 함유하는 CMV 저항성 식물체의 CMV 저항성의 유전 유무를 조사한 결과, 상기 V 저항성은 우성의 단일 유전자에 의해 결정되는 것이 규명되었다. 본 발명의 V 저항성 식물체는 당업계에 공지된 일반적인 조직 배양 방법으로 무성번식될 수

다. 예컨대, 기관 발생에 의한 미세증식법(형성된 기관이 없는 잎, 잎자루, 줄기 등), 자엽, 자엽축 등의 조직을 대상으로 새로운 눈을 상기 조직의 표면에 유도하는 방법) 또는 캘러스 유도를 통한 재분화 방법 등으로 무성번식 될 수 있다. 또 본 발명은 상기 CMV 저항성 식물체로부터 수득되고, 서열번호 22의 염기서열을 합하는 종자를 제공한다.

본 발명은 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하고 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 검출용 프라이머를 제공한다. 상기 프라이머는 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 최소 8개, 바람직하게는 최소 12개 상의 일련의 염기를 포함한다. 바람직한 프라이머는 서열번호 23 내지 28 중에서 선택되는 염기서열을 가지며, 보다 바람직하게는 서열번호 23 및 서열번호 24, 서열번호 23 및 서열번호 25, 서열번호 23 및 서열번호 26, 그리고 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머 조합 중에서 선택될 수 있다. 본 발명은 상기 프라이머를 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 프라이머를 이용한 PCR을 통해, 바람직하게는 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence) 분석, RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석, AFLP(amplified fragment-length polymorphism) 등을 통해 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 하기 단계를 포함하는 방법을 통해 수행될 수 있다:

(a) CMV 저항성 및 이병성 식물체로부터 얻은 DNA를 주형으로 하고 서열번호 22 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기를 포함하는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계;

(b) PCR 산물을 제한효소로 절단하는 단계;

(c) 절단된 DNA 단편들을 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동하는 단계: 및

(d) 전기영동이 완료된 겔의 DNA 밴드 양상을 비교하는 단계.

상기 방법에 사용될 수 있는 제한효소는 서열번호 22로 기재되는 염기서열 내에 존재하는 제한효소라면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 *Xba*I 또는 *Eco*R를 사용할 수 있다. 상기 방법으로 CMV 저항성 식물체를 검출할 수 있으며, 또한 숙된 식물체의 유전자형 (genotype)을 감별할 수도 있다 (도 4 내지 도 7 참조).

또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 프라이머를 이용하여 V 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 프라이머를 이용한 PCR을 통해 수행될 수 있다. 구체적으로는 하기의 단계들을 포함한다:

(a) CMV 저항성 및 이병성 식물체로부터 얻은 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계:

(b) PCR 산물을 아가로스 겔에 로딩하여 전기영동하는 단계: 및

(c) 전기영동이 완료된 겔의 DNA 밴드 양상을 비교하는 단계.

본 발명에서는 서열번호 1로 기재되는 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 CMV 저항성 식물체를 검출할 수 있음을 확인하였다 (도 1 참조).

또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 프라이머에 의해 증폭된 DNA 단편을 제공한다. 상기 단편은 CMV 저항성 식물체를 검출하기 위한 표지 인자로 사용될 수 있다. 상기 단편의 염기서열을 서열번호 2로 기재하였다. 따라서, 본 발명은 서열번호

2로 기재되는 염기서열을 갖는 표지인자를 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하

방법을 제공한다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

(a) CMV 저항성 및 이병성 식물체로부터 얻은 게놈 DNA를 적당한 제한효소로 절하는 단계;

(b) 절단된 DNA 단편을 아가로스 겔 상에서 전기영동하는 단계;

(c) 겔 상의 DNA를 나일론 막으로 전이시키는 단계;

(d) 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 표지인자를 탐침으로 하여 서던 블롯을 수행하는 단계; 및

(e) X-ray 필름 상에 노출시켜 밴드 양상을 비교하는 단계.

상기 방법에 사용될 수 있는 제한효소는 당업계에서 공지된 제한효소라면 제한없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 *EcoR* I, *EcoR* V, *Hind* III 및 *Xba* I 로 이루어진 군에서 선택되는 효소를 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명은 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리 범위를 본 실시예로 한정하고자 하는 것은 아니다.

<실시예 1>

CMV 저항성 고추 식물체의 순화 및 마커 개발을 위한 교배 집단 작성과 CMV 함성의 유전양식 구명

다양한 고추 식물체에 CMV를 접종하여 저항성 식물체를 스크리닝하였다. 그 결과, 열지엔초 계통 중 한 식물체가 CMV 저항성인 것으로 확인되었다. 선발된 식물체 'FP11'이라 명명하였다. 선발된 FP11의 CMV 저항성의 유전 유무를 테스트하기 위하여 자가수분 집단 및 교배집단을 작성하였다. 상기 교배집단은 FP11을 이병성 계인 FP14와 교배시켜 작성하였다. 교배된 F1 종자를 파종하여 자가수분시켜 F2 집단을 만들고, 다시 각각의 F2 식물체를 자가수분시켜 F3 집단을 만들었다. F2와 F3 집단을 대상으로 CMV 저항성을 테스트한 결과, CMV 저항성은 F2 집단에서 3:1의 비율 유전되며, F3 세대에서 호모(homo)와 헤테로(hetero)의 비율이 1:2로 분리되었다.로부터 CMV 저항성은 우성의 단일 유전자에 의하여 결정되는 것임을 확인할 수 있다.

<실시예 2>

식물체로부터 DNA 분리

DNA 추출은 프린스 등의 방법(Prince, J. P., *et al.*, *HortScience* 32:937-939, 97)을 변형하여 수행하였다. -80℃에서 보관한 고추 잎을 액체 질소를 이용하여 채한 후, 25mL의 DNA 추출 버퍼(7M 우레아, 0.35M 염화나트륨, 0.05M Tris-HCl 8.0, 0.02M EDTA, 0.25% Sarkosyl, 5% 페놀, 0.2% sodium bisulfate)와 잘 혼합하였다. 이후, 0.75mL의 20% SDS를 넣고 65℃에서 10분마다 흔들며 주면서 30분간 배양하였다.

클로로포름:이소아밀알코올 (24:1) 용액을 50mL 튜브의 끝부분까지 채워 15분간
 석여 주었다. 혼합액을 5,000rpm으로 15분간 원심분리한 후, 수득된 상층액을 무
 천 (cheesecloth)을 이용하여 새로운 50mL 튜브에 옮겼다. 이후, 상기 튜브에 동일
 부피의 이소프로판올을 첨가하고 혼합한 후, 1시간 동안 DNA를 침전시켰다. U자
 의 파스퇴르 피펫을 이용하여 침전된 DNA를 채취하여 1.5mL 마이크로 튜브에 넣고,
 5% 에탄올을 첨가하여 DNA를 재침전시켰다. 실온에서 30-40분 동안 건조시켰다.
 기 건조된 DNA 펠렛에 600-700 μ L의 TE 버퍼 (10mM Tris-Cl, 1mM EDTA)를 가하여 65
 에서 1시간 동안 배양하였다. 원심분리 과정을 3회 반복하였다. 이후, DNA를
 5mL 튜브에 옮기고 RNase (100 μ g/mL)를 첨가하여 RNA를 제거하였다. 정제된 DNA의
 농도는 형광계를 이용하여 측정하였다.

<실시예 3>

CMV 저항성 유전자 연관 RAPD 프라이머의 선발

CMV 저항성 유전자에 연관된 DNA 마커를 선발하기 위하여 RAPD(Random
 plified Polymorphic DNAs) (Williams, J. G. K. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18,
 31-6535, 1990)와 BSA(Bulked Segregant Analysis) 방법 (Michelmore, R.W., *et*
., Proc. Nat. Acad. Sci., 88:9828-9832, 1991)을 이용하였다. 상기 실시예 1의
 집단으로부터의 CMV 저항성 검정 결과를 바탕으로 저항성 F2 식물체 10개체의 DNA
 (pool)과 감수성 F2 식물체 10개체의 DNA 풀을 만들고, 풀로 만들어진 DNA 농도가
 ng/ μ L가 되도록 조절한 후, 이를 주형으로 사용하여 PCR을 수행하였다. 이 때

PD 프라이머를 위해 Operon RAPD 10-mer 키트 (Operon, Alameda, CA, USA) 중에서 리즈 A부터 시리즈 T까지의 약 400개 프라이머를 대상으로 PCR 반응이 양호하게 일어나는 프라이머를 147개 선발한 후, 선발된 프라이머를 사용하여 저항성 DNA 풀과 수성 DNA 풀간에 특이적으로 다르게 증폭되는 밴드를 탐색하였다.

PCR 반응 조성물은 1 X PCR 버퍼, 60ng 주형 DNA, dNTP 0.3mM, 프라이머 0.6pM, 5mM MgCl₂, 0.6Unit Taq DNA 중합효소 (Takara, Japan)를 혼합하여 총 부피를 25μl 조정하였다. PCR 증폭은 94℃ 4분간 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃ 1분, 36℃ 1 30초 및 72℃ 1분 50초를 한 사이클로 하여 총 45회 반복한 후, 72℃에서 5분간 반응시켜 종결하였다. 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, OPC-07 프라이머 (서열번호를 이용한 PCR에서 1개의 저항성 pool에만 특이적으로 나타나는 마커를 발하였다.

상기 마커가 CMV 저항성 유전자와 어느 정도 연관되어 있는지 알아보기 위하여, 항성 식물체와 이병성 식물체 그리고 F1, 저항성 F2 183개체 및 이병성 F2 64개체 대하여 다시 RAPD-PCR을 실시하였다. 그 결과, 도 2a 및 도 2b에서 보는 바와 이, 상기 마커가 100% 증반분리 (co-segregation)되는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 4>

RAPD 마커의 클로닝과 염기서열 결정

CMV 저항성 인자 특이 증폭 프라이머 (OPC-07 프라이머)를 이용하여 증폭된 DNA 겔로부터 분리·정제하여 pGEM-T 벡터 (Promega사)에 클로닝하였다. 클로닝된 클라

미드를 전기충격방법으로 대장균 DH 10B에 도입한 후, 항생제가 들어 있는 배지에
형질전환체를 선발하였다. 선발된 형질전환체로부터 제조한 플라스미드를 분리하
. 상기 플라스미드 내에 삽입된 DNA의 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열을
서열번호 2로 기재하였다.

<실시예 5>

CAPS 마커로의 전환 및 인버스 PCR을 수행하기 위한 서던 블롯 실시

저항성 식물체와 이병성 식물체의 게놈 DNA를 준비하고 DNA 제한효소 *EcoRV*,
HindIII, *XbaI* 및 *EcoRI*으로 절단한 후, 아가로즈 겔에 전기영동하였다. 나일론 멤브
인에 DNA를 이등시킨 후, 실시예 4에서 증폭된 DNA를 탐침으로 하여 서던 블롯을
시하였다. 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3에서 보는 바와 같이, *EcoRI*, *XbaI*,
*oRV*에 대해서 다형성을 나타내었고, *HindIII*에 대해서는 다형성이 나타나지 않았다.
기 결과를 바탕으로 *EcoRI*, *XbaI*, *EcoRV* 제한효소를 인버스 PCR과 CAPS 마커 전환
사용하였다.

<실시예 6>

CMV 저항성 유전자의 근접 DNA 염기서열 결정

실시예 5의 결과 (도 3)를 바탕으로 실시예 4에서 분석된 RAPD 마커의 염기서열
일부를 사용하여 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머의 염기서열을 하기 표
에 기재하였다.

표 1)

식스 PCR에 사용된 프라이머	염기서열 (5'-3')	서열번호
CRSC007a	GTC CGG ACG ATA GCC CAA AAG	3
CRINVR65	TTG GCC CTA TGA GTC CGT AC	4
CRINVR125	ACT GAC TAC GAG TTG TCA CC	5
CRINVR629	TAG GGG TTC AAG GAT CAC CC	6
CRINVR796	TAT CCT CTT ATG CAA TGC GC	7
CRINVR840	AAT CCT TGT ACC TCA CAA CG	8
CRINVR975	CGA TGC CAC TTC ATA ATG CC	9
Inv 1030514 R	GAC TTG GGC ACT ACA CTG GA	10
Inv 1030514 F	ACA TAG GCG TGT GCT CTG GA	11
CR 1541-3	GGA GTT TCA TCA TAT GAA GCC	12
InvXbTopF1010	GGT TCA AGG ATC ACC CAA ATA A	13
InvXbTopR107	TTC ACC TTA GTC CCC AAA CCT A	14
EV Inver F2	AAC CCA AGC CTA TTT TAG CC	15
EV-INV-XbaI	GGT AAT AGG GTT CAC CTT AGT C	16
CRINVF5085	CTT TGA GGC AAA GAA TGG AA	17
CRINVR4776	TTT GGT AAT GAC CGG AGA CC	18
INVER0627R	ATA GCA GAG GAG CAC CCT AC	19
INVER0627F1	GGT ACA AGG ATT CCC CAA AGT G	20
INVER0627F2	GAT TTA GTC AGT ATG ACG ATG CCA C	21

상기 표 1에 기재된 프라이머를 이용하여 저장성 식물체에서 인버스 PCR을 수행
었다. 증폭된 DNA의 염기서열을 프라이머 워킹 (primer walking) 방법을 수행하여
석하였다. 그 결과, 서열번호 22로 기재되는 약 5.6kb의 DNA 염기서열이 결정되었

<실시예 7>

CAPS 마커로의 전환

상기 서열번호 22의 염기서열에서 공지된 DNA 염기서열의 DNA 제한효소 사이트 알아낸 후, 저항성 식물체 및 이병성 식물체의 게놈 DNA의 제한효소 사이트들 비하여, 두 게놈 DNA 간에 다형성을 나타내는 제한효소인 *Xba*I (T'CTAG_A), *Eco* (G' AATT_C) 및 *Eco*RV (GAT' ATC)를 CAPS에 사용할 제한효소로 선택하고, 적절한 길이 제한 패턴을 나타내는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 위치시킨 프라이머를 제작하다. 즉, 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열로 구성된 프라이머들 4개 제작하였다(하기 표 2 참조).

표 2]

1	저항성 확인을 위한 CAPS 마커 염기서열 (5'→3')	개발을 위한 프라이머 명	방향	서열번호
	GTAGTAGGGTACGGACTCATA	SCC07S3	정방향	23
	GTCCCGACGATAGCCAAAAG	SCC07a	역방향	24
	GGAGTTTCATCATATGAAGCC	CR1541-3	역방향	25
	AGTGGAGCTTGGGGTAGTCC	FP5416R	역방향	26

서열번호 23과 24, 서열번호 23과 25 및 서열번호 23과 26 조합의 프라이머들 용하고, 저항성 식물체 및 이병성 식물체, 그리고 이들의 F2 집단으로부터 추출된 A를 주형으로 사용하여 PCR 증폭하였다. PCR은 94℃ 에서 1분 동안 주형 DNA를 변시킨 후, 94℃ 에서 1분; 58℃ 에서 1분; 및 72℃ 에서 2분을 한 사이클로 하여 총 5회 반복수행한 다음 72℃ 에서 10분 동안 반응시켜 종결하였다. 이후, 증폭된 A를 실시예 6에서 선정된 제한효소 (*Eco*RI, *Xba*I, *Eco*RV)로 절단하고, 아가로즈 겔 전기 영동하여 호모 (RR)와 헤테로 (Rr) 형이 구분되는지 확인하였다.

서열번호 23과 24의 프라이머 조합으로, PCR을 수행한 결과들 도 4에 도시하다. PCR 증폭된 DNA 단편의 크기는 1.0kb이었다. 증폭된 DNA 단편을 *Xba*I로 절단한 결과, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 확인할 수 있었다. 또한 밴드 패턴이 실시예 1에서 F3 병저항성을 테스트하여 예측한 F2 식물체의 유전형 등반분리되는 것을 확인할 수 있었다.

서열번호 23과 25의 프라이머 조합으로 PCR을 수행한 결과들 도 5에 도시하였. PCR 증폭된 DNA 단편의 크기는 1.477kb이었다. 증폭된 DNA 단편을 *Eco*RI (A)와 *si* (B)으로 각각 절단한 결과, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 볼 수 다. 또한 이 밴드 패턴이 실시예 1에서의 병 저항성 결과와 등반분리되는 것을 확인할 수 있었다.

서열번호 23과 26의 프라이머 조합으로 PCR을 수행한 결과들 도 6에 도시하였. PCR 증폭된 DNA 단편의 크기는 1.846kb이었다. 증폭된 DNA 단편을 *Eco*RI으로 단한 결과, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 볼 수 있었으며, 이 밴드 패턴 또한 실시예 1에서의 병 저항성 결과와 등반분리되는 것을 볼 수 있었다.

상기 결과들은, 서열번호 22로 기재되는 염기서열 중 임의의 일련의 염기서열을 라이머로 제작하여 PCR을 수행하고, 그 결과로 얻은 PCR 산물을 서열번호 22 내에 재하는 제한효소로 절단하는 경우, CMV 저항성 유전자의 존재유무 및 그 상태, 즉 모 또는 헤테로인지 구분할 수 있음을 보여주는 것이다. 즉, 서열번호 22로 기재는 염기서열이 CMV 저항성 유전자와 상당히 근접되어 있으므로, 상기 염기서열들이 나타내는 어떠한 다형성을 사용하더라도 그 유전자의 존재여부를 파악하는 데 사용 수 있다.

<실시예 8>

CAPS 마커로의 전환 가능한 원편의 최소 염기서열의 수 결정

실시예 6에서 결정된 서열번호 22의 염기서열의 이용하여 CAPS 마커로의 전환 가능한 가장 적은 일편의 염기서열의 수를 결정하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다. 이를 위해 서열번호 23 (Forward [SCC07S3]: 5'-GTAGTAGGGTACGGACTCATA)의 염기서열을 서열번호 27 (Forward [SCC07S3-change]: 5'-gGTAGTAGGGTACGg)의 염기서열로, 그리고 서열번호 25 (Reverse [CR1541-3] : 5'-GGAGTTTCATCATATGAAGCC)의 염기서열을 서열번호 28 (Reverse [CR1541-3] : 5'-gGGAGTTTCATCAgc)의 염기서열로 각각 변형하였다 (소문자는 임의의 추가). 상기 변형된 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94℃ 에서 1분 동안 주형 DNA를 변성시킨 후, 94℃ 에서 1분: 50, 52, 54, 56 또는 58℃ 에서 1분: 및 72℃ 에서 2분을 한 사이클로 하여 총 40회 반복수행한 다음 72℃ 에서 10분 동안 반응시켜 종결하였다. 증폭된 A 단편의 크기는 1,477kb이었다.

이후, 증폭된 DNA를 *EcoRI*로 절단하여 아가로스 겔에 전기영동한 결과, 도 7에 표시된 바와 같이, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 볼 수 있었으며, 밴드 패턴 또한 실시예 1에서의 병 저항성 결과와 등반분리되는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 상기 결과는 염기서열이 나타내는 다형성은 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는 프라이머를 작성하여 상기 프라이머로 PCR 수행한 후, PCR 산물을 적당한 DNA 제한효소로 절단하여 나타나는 밴드 패턴의 차이로 CMV 저항성 유전자의 존재여부를 식별하는 것이 가능한 것을 입증한 것이다.

발명의 효과

상기한 바와 같이, 본 발명은 오이 모자이크 바이러스 저항성 유전자와의 연관도가 매우 높은 유전자 염기서열을 제공함으로써 감별의 오류가 거의 없이 효율적으로 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 감별할 수 있도록 한다. 또한, 식물 내에서 상기 염기 서열의 존재 유무를 감별할 수 있는 본 발명의 분자 표지를 이용하면, 오이 모자이크 바이러스를 직접 식물체에 접종하지 아니하고도 신속하고 안전하게 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 선발할 수 있다.

-

특허청구범위]

요구항 1]

조직배양에 의해 무성번식되고, 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 함유하는 이 모자이크 바이러스 저항성 식물체.

요구항 2]

제1항의 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체로부터 수득되고, 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 갖는 종자.

요구항 3]

서열번호 22로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드

요구항 4]

서열번호 22로 기재되는 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는 이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 검출용 프라이머.

영구항 5]

제4항에 있어서, 서열번호 23 내지 28 중에서 선택되는 염기서열을 포함하는 프
이머.

보구항 6]

제4항의 프라이머를 이용하여 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 검출하는 방법.

보구항 7]

제6항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 23 내지 28로 이루어진 군에서 선택
 는 염기서열을 포함하는 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

보구항 8]

제4항의 프라이머를 이용하여 CAPS 분석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체의 유전자형 (genotype)을 감별하는 방법.

연구항 9]

제8항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 23 내지 28로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 포함하는 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

연구항 10]

서열번호 1로 기재되는 프라이머를 이용하여 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물을 검출하는 방법.

연구항 11]

서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물 검출용 표지인자를 탐침으로 이용하여 RFLP(restriction fragment length polymorphism) 분석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물 검출하는 방법.

연구항 12]

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 식물체는 오이, 수박, 수, 메론, 배추, 담배, 페튜니아, 목화 및 장미로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

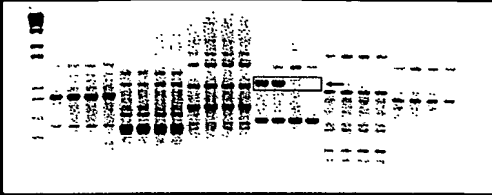
부구항 13)

서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식
체 검출용 표지인자.

[5.0]

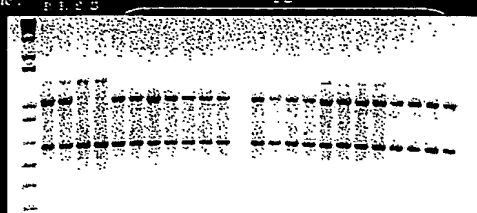
1)

REGION : 000-01 000-10 000-11 000-12 000-13 000-14
RSSRRSSRRSSRRSSRRSSRRSS



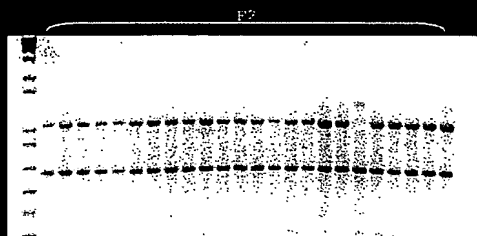
2a]

Plant sample: P1, P2



지인자 테스트: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12

리핑 테스트: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12



지인자 테스트: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12

리핑 테스트: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12

	(line)ll	I=0ll	A=0l	F=00V	I=0r
	R N	R N	R N	R N	Ladder

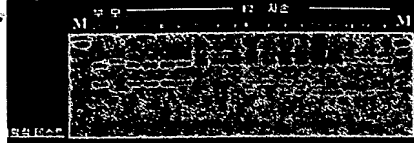
[illegible]

```

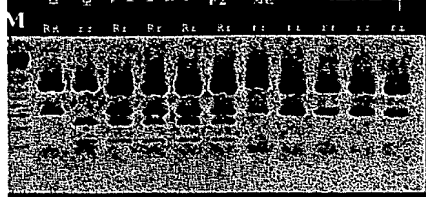
F2:      P  S      P P P P P P P P P P P P S S S S
F3:      P P      P P P P P P P P P P P P P P P P

```

5]



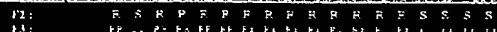
모: R R R R R R R R R R R R
부: R R R R R R R R R R R R



6]



모: S R R R R S R R R R R R S
부: R R R R R R R R R R R R R

[illegible]

```

tytagaa      720 tggattaat taattttcta ggcttacttt cttaaaatc rggcattgca taaggagata
acatayaaga atgactttta aaacttttga aggtacaagg attcacctaa gtgaatgatt      840 ttctttgaaa
ttatgca gtacaaggat ttccaagt gtatgataaa tggagtttgg      900 gtgtacaagg attctttcaa
atggatt aattgaatt ctatgaagat ttatgcagta      950 tgacgatgcc acttcataat gccttactta
ttcagac tatctttcga attcttcttt      1020 tgggcta

7 <210> 3 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRSCC07a
ser for inverse PCR <400> 3 gtcccagca tagcccaaaa g
<210> 4 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVR65
ser for inverse PCR <400> 4 ttggccctat gattccgtac
<210> 5 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVR125
ser for inverse PCR <400> 5 actgactacg agttgtcacc
<210> 6 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVP629
ser for inverse PCR <400> 6 tagggattca aggatcacc
<210> 7 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVR796
ser for inverse PCR <400> 7 tatctcttta tgcaatgcgc
<210> 8 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVR840
ser for inverse PCR <400> 8 aatccttgta cctcacaacg
<210> 9 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVP975
ser for inverse PCR <400> 9 cgaagccact tcataatgcc
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Inv 1030514
primer for inverse PCR <400> 10 gacttgggca ctacactgga
<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Inv 1030514
primer for inverse PCR <400> 11 acataggcgt gtgctctgga
<210> 12 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CR 1541-3
ser for inverse PCR <400> 12 ggagtttcat catatgaagc c

```

<210> 13 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 bTopF1010 primer for inverse PCR <400> 13 ggttcaagga tcacccaaat aa
 <210> 14 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> InvXbTopR107
 ser for inverse PCR <400> 14 ttcaccttag tccccaacc ta
 <210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> EV Inver F2
 ser for inverse PCR <400> 15 aacccaagcc tattttagcc
 <210> 16 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> EV-INV-XbaI
 ser for inverse PCR <400> 16 gstaataagg ttcaccttag tc
 <210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINV5095
 ser for inverse PCR <400> 17 ctttagacca aagaatgaa
 <210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVR4776
 ser for inverse PCR <400> 18 tttagtaag accgagagcc
 <210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> INVER0827R
 ser for inverse PCR <400> 19 atagcagagg agcacccctac
 <210> 20 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> INVER0827F1
 ser for inverse PCR <400> 20 ggtacaagga ttccccaag tg
 <210> 21 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> INVER0827F2
 ser for inverse PCR <400> 21 gatttagtca gtatgacgat gccac
 <210> 22 <211> 5591 <212> DNA <213> Capsicum annuum <400> 22 tctagaacta
 agttcat gaggctcaat cctctgacct ttactagctc taaggtttag 60 gaggatcctc aaaggttcat
 tgagata gaaaaaacat tttagtgat acatgcttcc 120 gactctgaag gtgtataatt ttcaaatat
 :tgaagg atgtgtata tcaatggtat 180 gagaatagg agcagttgag gggggatgat gctgagttag
 tatggga tatttttcta 240 gtacctttct tgattatttc ttctctcagg agataaggaa agcaaatgct
 gatttta 300 tgaataactt gataagggtt tgatccacc tagtatttct ctgtagggtg ctctctgct
 atttattgt tagaagatg gtcccttta gatgtgata gallatcgt agttgaataa 420 ggtgactatg

```

aaaagt accctctccc taagattgat gatitattca tccagcttca      480 gsgtgcaag tacttttca
ttaatct cigttaaagt tattattagt tgaanaattag      540 ggaatggat atccctaagg ctacttttca
ccagtgt ggtcattatg agtttttgg      600 gatgtcctat gatttgacta atgtccggt ggcattcaag
ttatga acatagtatt      660 ctgttagttc cggatttat ttgtattgt gtaaatagat gatattttg
atctaa      720 gagcgaggt gatcagccg atcatctcca tatagtattg caactttta aagatcaact
gttgacgcc aaattttta agtgaatt atgttgaat gtagtacct tcttggtta      840 tattattct
gagsga ttatgttga tccacaaaaa tttaagcga tgaagaagt      900 gcctaaaacc atgatttcaa
atattta gattttttg gtttagttg atattatagg      960 aggttttgg agattttct atcaattgat
ttattta ttaagttaac tcagaaaaaa      1020 ggtatggttt ctatgtcca atgttttca ggttagcttt
aagtga aggataagtt      1080 gactttgat atgatttga cctaccga aggttttaat gttttttaa
tgatga      1140 tccagttag gacttggtt gttttgatg tagaacaat aggtttcgg cctatgttc
) taggaattg aagttcatg aatgaatta tgcacacat aactagaat tattagtgt      1260 ggtatttca
aagctta ggtatctta ttgtatggg ttcatgtta tatatgttt      1320 gatcataaga ttctgtatg
gttacc cagaaggagt tgaatctag gcaaggaca      1380 tggcttgat ttctaaagg ctatgacatt
tccatt acaaccagg taactctaac      1440 aiggttgtt gtattcttag taggttgcc atgggaagat
aaatat ggtgaggaa      1500 aatgagatt tggtaagta tattaccga ttgttaacc ttgagttcg
tttgat      1560 tctgagatg gaggatggt tttaagag gtagtgaat catctcttag tttaagta
) aaagcgaac atgtcttga tctatctta atgcaatca aagatgagt ggtcaacag      1680 aaggttatg
tcaagat tggtagtaat ggtattttaa ggtaccaag tagatttgt      1740 gttccgatg ttaatgggt
agaatga attttgtt gactcatga gtctgattt      1800 atggctatc ttggtttgac gaagatgat
gattca aggagattta ttggtgaat      1860 aatatgaaga gagatgtgc aaattttgt gctatgtca
tttgcca acaagtgaag      1920 gtgggaacc taaggcttg tggattctat catctgtat gaagtgaag
atcagta      1980 tggatttgt tccagtctt ccacgatct gtagtaaat ttatttgatt tggatcatca
) ttgataggat gtctaagct actacttct tccagttag gactaataat tcatggagag      2100 actacgcaa
tttatt caggatata tcaagttgca tgggtctta gtttctatta      2160 tatctgatc aggtactcag

```

tctgcta accttttagtg attatttcat gtaggtttgg 2220 ggactaaagg gaaccttatt accttttcc
 :acagaa agatgtacaa gcagagagga 2280 ctattcagac ttgggtagt atgctaagg tatttgtagt
 :ttttgt ggtatttggg 2340 ttaccatat gccctcttta ctgttttgt ataatcaaa ctattatct
 attcaga 2400 tgcctcgttt gaggcttgg atgtaggag atgtcttct cctattgggt ggttcaaat
) tggtaagact agattggta gccaggact tgttcataa gctatagata aggtgaagg 2520 gattaggat
 :ttaata ccacctaatg tcacaaaaa tctatgtag acgtgagga 2580 aagagagta gatttgatg
 gcaatta ggtgctcttg aaatatccc ccatgaagga 2640 tgtgataga ttgggaaga agcgaagct
 tctctgt tatgtttgt cgtacttga 2700 ccttaggaga atgggttatg ttgtttatga ttggatttg
 :gtattg tgggttccat 2760 tcacctggag ttccacgtg tgaattgaa gaagtcatg ggttatcct
 tgaattg 2820 cctttgggg agtttggtt ttcatattc ctgtcttat gaggatccc tgaattagat
) ttggatagg aaagtctatc attgaggaa taaggatgtg gcttcataa atgtctatt 2940 gaggaatcat
 gttgaag aagctacttg ggaagctaaa gaggacatga agtccaaata 3000 tccattcttg ttccctattc
 atagtg ctcicaagtt atgtgttttc cttaacatat 3060 ttgtatttg actttgtta aggaaggtg
 tgtgttt tgttttaaa catacaaag 3120 gatgctctgt ctcatattc agggacgaat aatcctacgg
 tgggggg gggatgtaa 3180 cactcagat ttgtgtctt tggaaaatt ttgactttt gaacttacg
 atgaat 3240 gactccttc acgagtcga aggtgtgtc ttggcaggtc ataggacccc aatcatagga
) tgaccagtaa agcttttca tgaatcggc ttggatga cttgcacccc actagtga 3360 aagattcatt
 agtcga atatccagat calagggtg ccaatgaat ttgtctttc 3420 tactctcttg attaaactag
 taatga tctaataac tcttaacag tcattgtgtg 3480 cctttccgg caaatccag gtatgcccc
 :attctt ccttgactat aactgaaccc 3540 gacgagacat aatgtgtgac tatgagtagt aggtacgga
 ataggc caatagtatg 3600 gatggcttgt gacatgccc agacaacaag tcatgtgac aactcgtatg
 tcttagc 3660 gactcttcat gtaacccga gcgactagg ggtatattt tagcttcat ttaggcatc
) ttactaatt ctctctttcc caacaaata cccccgacat ataacattt gggacccta 3780 ttctataac
 acaatc aatgacacct cttaaccccc ttaattccc cactcaagg 3840 caagactagg gtttcaaga
 gtcac tagggtctta cgagtgaatt ctcttcaaa 3900 ttcttgggg attaaggcat gtatcttat

```

taaacatt tttttcatt atgtaattaa      3960 ttggtttatt attcacatgg ttttgatgtt gggtttagca
tgggttg agtggttttg      4020 atgtaatttg tttaaatgct ttcccttgc ttattatgga ataattttat
aattgat      4080 gattagtaaa atcatttggg tcttgggaa tggtaaatga aataggsgta caaggattcc
) cttaatttgt aaacaatgga aataggsggt caaggatcac ccaataaatt ggaattttga      4200 ataattggat
tgtattg aaattgataa gaacctcaac acacttgcat aattggttct      4260 agaattgat taattaatit
agccca cttctttaga attagcgcat tgcataagag      4320 gataacatac aagaatgata ttaaaaacgt
taggtac aaggattcac ctaagtgaat      4380 gatttttctt gaaaaccttg tgggtacaa ggaattccca
tgtatga taaatggagt      4440 ttgggtgtac aaggattctt ccaagtatg gattaatga atttctagta
tttagtc      4500 agtatgacga tgcaccttca taatgcctta ctatgttgc agactatctt tcgaattctt
) ctttgggct atcgctgggg gcatgtccaa acittgatg atttttggt ctatttagag      4620 gatttgtgga
ctatgga ttggatgggt attattgag catagaactt tccctatttt      4680 gaatttctct atcttgttat
ttgaaa ttcatccact actagctgtg ttgtgtcta      4740 ttggctagg caaaaaaggg tggctccgg
ttaccaa acttgggaga cccctcatgg      4800 ccaggccctg gtttgggtca tgatatttc aacctcaac
aatcat tctgaccatg      4860 agcagcattg attccacatc ttcatittga atattaatga tcttcaact
gcaacac      4920 caataagat acaacatag gcgtgtgtc tggagagctc ctgaggttta ttttttagtg
) catacttatt tgtcatttt ccttaataca tctttttaaa tctataatgg ctcatatga      5040 tgaactcca
gctatgg ataacaatgc ttcaaacaca atcttagcca taattgaatc      5100 cttgagccaa agaattgaaa
tggaaag ctacttaaca aggaagatgt aaaaattgga      5160 aggccgttta gattccacca actcaacccc
aacctat aatgcttata ctatgggaca      5220 tactcaaat atttccgcta cgaatttctt agaaacccctc
:aatgt acattctca      5280 accacaaccc catgaaccca tcacacaaac cactacttat ccacaaatt
stctcat      5340 tagcccata caacctcaat tcaaccaaga agaccacaa accaagaacc agcatctaa
) ttaccctaaa ataaaggact acccaagct cactttaagc aaatccact aacccaagcc      5460 tattttagcc
ataaca catccaagtt gaagatataa aggaagaggg atctaagga      5520 gaaatgaag tgatggatga
ggttgat aattatgaa ttgaantatt taatatgic      5580 aagatatga t
1 <210> 23 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> SCC07S3

```

```

ser for CAPS <400> 23 gtagtaggt acggactcat a
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> SC007a

ser for CAPS <400> 24 gtcccgacga tagcccaaaa g
<210> 25 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CR1541-3

ser for CAPS <400> 25 ggagtttcat catatgaagc c
<210> 26 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FPS416R

ser for CAPS <400> 26 agtggagctt gggtagtcc
<210> 27 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

YIS3-change primer for CAPS <400> 27 gtagtaggg tacag
<210> 28 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CR1541-3

ser for CAPS <400> 28 ggagttttca tcagc

```

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002732

International filing date: 27 October 2004 (27.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0075272
Filing date: 27 October 2003 (27.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 12 November 2004 (12.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.